

# Polymeric biomaterials with phosphorylcholine groups at the surface : on the photochemical surface modification of polyurethanes using aryl azides with a phosphorylcholine endgroup to improve hemocompatibility

Citation for published version (APA):

van der Heiden, A. P. (1998). *Polymeric biomaterials with phosphorylcholine groups at the surface : on the photochemical surface modification of polyurethanes using aryl azides with a phosphorylcholine endgroup to improve hemocompatibility*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19980319ah>

**Document status and date:**

Published: 01/01/1998

**DOI:**

[10.26481/dis.19980319ah](https://doi.org/10.26481/dis.19980319ah)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 09 Dec. 2024

## Summary

Artificial vascular grafts and heart valves are of great importance in cardiovascular surgery. Although *healthy* veins from the body (especially from the legs) are often used to replace diseased coronary arteries, removal of those veins often causes lasting discomfort to the patient. Furthermore, the diameter does not always match that of the artery to be replaced. The use of animal (porcine) valves to replace human heart valves has the disadvantage that they have to be replaced after about seven years because of calcification. A major disadvantage of the use of artificial vascular grafts and heart valves is that thrombosis can occur which can lead to occlusion of vessels. Therefore, continuous anti-coagulation therapy is necessary, which can cause bleeding problems. Thrombosis occurs since the natural lining of endothelial cells, which is essential in regulating blood clotting, is absent.

Much research has been done to find materials that minimize surface-induced thrombotic reactions. Polyurethanes are a promising class of materials for the preparation of artificial vascular grafts and heart valves. These polymers have excellent mechanical properties and relatively good hemocompatibility, compared to other polymers. In order to improve the blood compatibility of these and other polymers many surface modification methods have been developed. Classical methods include the use of heparin and poly(ethylene glycol) which can be attached to the surface of a polymeric material in various ways. A new and promising method uses phosphorylcholine groups that can be incorporated in the polymer chain (as a side group) or attached to the surface. The idea originates from the observation that phospholipid vesicles containing phosphorylcholine are non-thrombogenic (in contrast to phospholipids containing phosphorylserine). Since phosphorylcholine is the hydrophilic endgroup that interfaces with blood and since it was shown that also phosphorylcholine incorporated in other molecules has non-thrombogenic properties, interest in surface modification methods that can couple phosphorylcholine groups to a polymer surface is growing.

This study describes a new method to couple phosphorylcholine groups covalently to a polyurethane (Pellethane) surface with the aim of improving the hemocompatibility of the material.

**Chapter 2** describes the synthesis of several compounds that can be used to attach phosphorylcholine groups to a polymer surface. The compounds consist of a photoreactive group (an azidophenyl moiety) and a phosphorylcholine group that are separated by a variable-length spacer chain consisting of ethylene glycol units. The photoreactive azidophenyl group is very stable until UV irradiation turns it into a very reactive group capable of reacting with weakly nucleophilic groups at a polymer surface. The synthetic schemes presented here allow for the rapid and safe preparation of phosphorylcholine-containing aryl azides.

**Chapter 3** presents proof that aryl azides can indeed couple covalently to a polyurethane (Pellethane® 2363-55D) surface. For this purpose an aryl azide was synthesized carrying a fluorescent dimethylaminonaphthalenesulfonyl (dansyl) moiety. Spraying with a solution of this compound followed by irradiation with UV light resulted in the covalent coupling to a polyurethane surface which could be proven by a rapid hydrolysis experiment. It was further found that a surface density of about 25 nmol/cm<sup>2</sup> could be reached by this surface modification method. It was suggested that this high surface density could be due to the surface roughness of the polymer (resulting in an increased surface area) and (minor) equilibrium swelling which causes modification of the polymer to a certain depth.

In **Chapter 4** two phosphorylcholine-containing aryl azides are presented that were used for the surface modification of a polyurethane (Pellethane) to improve hemocompatibility. After the photochemical surface modification (comparable to the procedure described in Ch. 3) the surfaces were analyzed with contact angle measurements which showed decreased contact angles for all modified surfaces, as would be expected for surfaces modified with relatively hydrophilic phosphorylcholine groups. ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) measurements showed that the composition of the surface had changed and that phosphorylcholine groups were now present at the polyurethane surface (analyzed depth about 50 Å). *In vitro* hemocompatibility was determined with thrombin generation assays and platelet adhesion studies (using platelet-rich plasma). The thrombin generation tests showed that clotting times of the polyurethane surfaces modified with phosphorylcholine groups were clearly prolonged, depending on the amount of phosphorylcholine present at the surface. Platelet adhesion studies with scanning electron microscopy demonstrated that fewer platelets (showing less

activation) adhered to the modified surfaces than to the unmodified polyurethane. Hence, these tests indicate an improved hemocompatibility for the modified surfaces.

**Chapter 5** describes single protein adsorption experiments on modified polyurethane surfaces. Since ellipsometry is one of the few techniques that can measure protein adsorption continuously and *in situ* this method was selected for the experiments. For this purpose, thin polyurethane films were prepared on silicon wafers after which phosphorylcholine groups were introduced by the method described in Chapter 4. Adsorption was measured of the following human proteins: albumin (Alb), fibrinogen (Fg), and high molecular weight kininogen (HMWK) (the importance of these proteins in thrombosis was outlined in Ch. 1). It was shown that the presence of phosphorylcholine groups at the surface had little effect on the adsorption of the proteins, against expectations. In contrast, pre-treatment of the surfaces with a suspension of dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) vesicles diminished protein adsorption on all surfaces. On a DOPC bilayer formed on silicon protein adsorption was absent, as anticipated. These results show that the mere presence of phosphorylcholine groups at a polyurethane surface is insufficient to suppress protein adsorption (at least in single protein adsorption experiments); only an ordered and tightly packed layer of phosphorylcholine-containing molecules can probably suppress protein adsorption effectively.

In **Chapter 6** the results of this study are discussed and some of the difficulties of designing and testing a new "hemocompatible" material are presented.

## Samenvatting

Synthetische bloedvaten en hartkleppen zijn van groot belang in de cardiovasculaire chirurgie. Hoewel *gezonde* aderen uit het lichaam (in het bijzonder die uit de benen) vaak gebruikt worden om aangetaste kransslagaderen te vervangen kleven er enkele nadelen aan het gebruik van deze aderen. De verwijdering van aderen uit het been kan leiden tot langdurige klachten bij de patiënt en bovendien wijkt de diameter soms te veel af van die van de te vervangen kransslagader. Het gebruik van dierlijke kleppen (van varkens) om de hartkleppen van een patiënt te vervangen heeft onder andere als nadeel dat ze na circa zeven jaar vervangen moeten worden wegens verkalking. Een belangrijk nadeel van het gebruik van synthetische bloedvaten en hartkleppen is dat trombose kan optreden waardoor vaten verstopt kunnen raken. Daarom moeten continu anti-coagulatie medicijnen gebruikt worden wat kan leiden tot inwendige bloedingen. Trombose treedt op doordat de natuurlijke endotheellaag afwezig is waardoor de regulatie van de bloedstolling verstoord wordt.

Er wordt veel onderzoek gedaan om materialen te vinden die zo min mogelijk oppervlakte-geïnduceerde trombotische reacties veroorzaken. Polyurethanen vormen een veelbelovende klasse van materialen voor de vervaardiging van synthetische bloedvaten en hartkleppen. Deze polymeren bezitten zeer goede mechanische eigenschappen en een relatief goede bloedcompatibiliteit, vergeleken met andere polymeren. Om de bloedcompatibiliteit van deze en andere polymeren te verbeteren zijn vele oppervlaktemodificatie-methoden ontwikkeld. Van oudsher worden vaak heparine en poly(ethyleen glycol) gehecht aan polymeren. Een nieuwe en veelbelovende methode maakt gebruik van fosforylcholine-groepen die aangebracht kunnen zijn in de polymeerketen (als zijgroep) of aan het oppervlak. Het idee is ontstaan vanuit de waarneming dat fosfolipide vesicles die fosforylcholine bevatten niet-thrombogene zijn (in tegenstelling tot fosforylserine-bevattende fosfolipiden). Omdat fosforylcholine in deze fosfolipiden de hydrofiele eindgroep vormt die in contact staat met bloed, en bovendien aangetoond werd dat ook fosforylcholine gekoppeld aan andere molekulen niet-thrombogene eigenschappen bezit, is de belangstelling voor oppervlaktemodificatie-methoden die fosforylcholine-groepen kunnen koppelen aan polymeren sterk gegroeid.

Het hier beschreven onderzoek gaat over een nieuwe methode om fosforylcholine-groepen covalent te koppelen aan een polyurethaan-oppervlak met als doel de bloedcompatibiliteit te verbeteren.

**Hoofdstuk 2** beschrijft de synthese van enkele verbindingen die gebruikt kunnen worden om fosforylcholine-groepen te koppelen aan een polymeer-oppervlak. De verbindingen bestaan uit een fotoreactieve groep (een azidofenyl-groep) en een fosforylcholine-groep die van elkaar gescheiden zijn door een keten opgebouwd uit ethyleenglycol-eenheden. De fotoreactieve azidofenyl-groep is zeer stabiel maar kan door bestraling met UV-licht makkelijk omgezet worden in een zeer reactieve groep die kan reageren met zwak nucleofiele groepen op een polymeer-oppervlak. De hier beschreven syntheses maken een snelle en veilige productie mogelijk van fosforylcholine-bevattende arylazides.

In **Hoofdstuk 3** wordt aangetoond dat arylazides covalent kunnen koppelen aan een polyurethaan (Pellethane® 2363-55D) oppervlak. Voor dit doel werd een arylazide gesynthetiseerd met een fluorescerende dimethylaminonaftaleensulfonyl (dansyl) groep. Wanneer een oppervlak bedekt werd met deze verbinding, gevolgd door UV-bestraling, resulteerde dit in covalent gekoppelde molekulen, wat aangetoond kon worden door een snel hydrolyse-experiment. Verder werd gevonden dat een oppervlakte-dichtheid van ongeveer 25 nmol/cm<sup>2</sup> bereikt kon worden met deze methode. Deze hoge oppervlakte-dichtheid zou mede veroorzaakt kunnen worden door de ruwheid van het polymeer-oppervlak (wat resulteert in een groter oppervlak) en een (geringe) zwellung van het polymeer waardoor modificatie optreedt tot op zekere diepte.

In **Hoofdstuk 4** worden twee fosforylcholine-bevattende arylazides gebruikt voor de oppervlakte-modificatie van een polyurethaan (Pellethane) om de bloedcompatibiliteit van het polymeer te verbeteren. Na de fotochemische oppervlakte-reactie (vergelijkbaar met de procedure beschreven in Hoofdstuk 3) werden de polymeer-oppervlaktes geanalyseerd met contacthoek-metingen waaruit bleek dat de contacthoeken van alle gemodificeerde oppervlaktes afgenomen waren, zoals te verwachten is voor oppervlaktes met gekoppelde (hydrofiele) fosforylcholine-groepen. ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) metingen toonden aan dat de samenstelling van het oppervlak veranderd was en dat nu fosforylcholine-groepen aanwezig waren op het polyurethaan-oppervlak (de geanalyseerde diepte was ongeveer 50 Å). De bloedcompatibiliteit *in vitro* werd

bepaald met thrombine-generatie tests en analyses van de adhesie van bloedplaatjes (voor beide typen experimenten werd plaatjes-rijk plasma gebruikt). De thrombine-generatie tests toonden dat de bloedstollings-tijden van de polyurethaan-oppervlaktes die gemodificeerd waren met fosforylcholine-groepen duidelijk langer geworden waren, afhankelijk van de hoeveelheid fosforylcholine op het oppervlak. Plaatjesadhesie werd bestudeerd met "scanning" elektronenmicroscopie waaruit bleek dat minder bloedplaatjes (die ook minder geactiveerd waren) aan de gemodificeerde oppervlaktes hechtten dan aan de niet-gemodificeerde oppervlaktes. De tests wijzen dus op een verbeterde bloedcompatibiliteit van de gemodificeerde polyurethaan-oppervlaktes.

In **Hoofdstuk 5** worden enkelvoudige eiwit-adsorptie experimenten beschreven op gemodificeerde polyurethaan-oppervlaktes. Ellipsometrie werd gebruikt voor de eiwit-adsorptie metingen omdat het een van de weinige technieken is waarmee eiwit-adsorptie continu en *in situ* gemeten kan worden. Op silicium-wafers werden dunne polyurethaan-films aangebracht waarna er fosforylcholine-groepen aan gekoppeld werden op dezelfde manier als beschreven in het vorige hoofdstuk. De adsorptie werd gemeten van enkele menselijke eiwitten: albumine (Alb), fibrinogeen (Fg) en hoog-moleculairgewicht kininogeen (HMWK) (het belang van deze eiwitten werd geschetst in Hoofdstuk 1). Uit de experimenten bleek dat de aanwezigheid van fosforylcholine-groepen op het oppervlak weinig invloed had op de eiwit-adsorptie, wat tegen de verwachting was. Wanneer de polymeer-oppervlaktes voorbehandeld werden met dioleoylfosfatidylcholine (DOPC) vesicles was de eiwit-adsorptie duidelijk lager op alle oppervlaktes. Op een DOPC-dubbellaag, gevormd op silicium, adsorbeerde geen van de eiwitten, zoals verwacht. Deze resultaten laten zien dat enkel de aanwezigheid van fosforylcholine-groepen op een polyurethaan-oppervlak onvoldoende is om eiwit-adsorptie te onderdrukken (tenminste in enkelvoudige eiwit-adsorptie experimenten); voor een efficiënte onderdrukking van de eiwit-adsorptie moet waarschijnlijk een geordende en dicht gepakte laag van fosforylcholine-bevattende molekulen op het oppervlak aanwezig zijn.

In **Hoofdstuk 6** worden de resultaten van deze studie bediscussieerd en worden enkele moeilijkheden beschreven die optreden bij het ontwikkelen van "bloedcompatibele" materialen.